

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK



# **Alternativni mehanizmi produžavanja telomera** (Alternative lengthening of telomeres)

SEMINARSKI RAD

Valentina Jurkaš

Preddiplomski studij Molekularne biologije

(Undergraduate study of Molecular biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

*Zagreb, 2014.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TELOMERE .....	1
2.1. G-KVADRUPLEKSI.....	2
2.2. VIŠI STUPANJ ORGANIZACIJE TELOMERA .....	3
2.3. SENESCENCIJA.....	5
3. TELOMERAZA .....	6
4.1. KARAKTERISTIKE STANICA S MEHANIZMOM ALT .....	7
4.2. ALT I HOMOLOGNA REKOMBINACIJA .....	9
4.3. JEZGRENA TJELEŠCA ALT-PML-NB.....	11
4.4. ALT I DISFUNKCIJA TELOMERA .....	12
5. TELOMERAZA ILI ALT?.....	14
6. ZAKLJUČAK .....	16
7. LITERATURA.....	17
8. SAŽETAK .....	19
9. SUMMARY .....	20

## 1. UVOD

Jedna od karakteristika genoma eukariotskih organizama njegova je organizacija u linearne kromosome. Na njihovim se krajevima nalaze se specifične strukture koje se sastoje od kratkih uzastopnih ponavljanja DNA i asociranih proteina, a nazivaju se telomere. Zbog problema replikacije krajeva kromosoma u kojoj dolazi do erozije 3' krajeva, njihovo je održavanje neophodno za stanice koje neograničeno proliferiraju. U normalnim somatskim stanicama dolazi do progresivnog skraćivanja dužine telomera te se smatra da kritična dužina telomera inducira replikativnu senescenciju ili apoptozu stanice onemogućujući neograničenu proliferaciju čime djeluje kao važan mehanizam supresije tumora.

Značajka je većine tumora aktivacija mehanizma održavanja telomera te se sukladno tome njegova inhibicija smatra vrlo važnom potencijalnom metom antitumorskih tretmana. U većini ljudskih tumora aktivira se enzim telomeraza koji reverznom transkripcijom *de novo* na krajeve kromosoma nadodaje nova telomerna ponavljanja, a normalno je aktivna samo u embrionskim i adultnim matičnim stanicama. Međutim, 10-15% tumora produljuje telomere u odsutstvu telomeraze mehanizmima alternativnog produžavanja telomera (ALT, engl. *alternative lengthening of telomeres*) koji djeluju preko procesa vezanih uz popravak DNA i rekombinaciju. Dokazi aktivnosti ALT pronađeni su samo u abnormalnim situacijama (tumorskim stanicama i imortalnim staničnim linijama) te postoje dokazi da tretman tumora telomeraznim inhibitorima može djelovati selektivno na stanice tumorske populacije koje preživljavaju uz pomoć mehanizma ALT.

Bolje razumijevanje procesa vezanih uz ALT, njihovih molekularnih mehanizama te uloga koje imaju u normalnoj biologiji telomera ključno je za identifikaciju tumora u kojima je ALT aktivan, razvoj boljih prognostičkih markera i razvoj novih antitumorskih terapija usmjerenih protiv ALT-a.

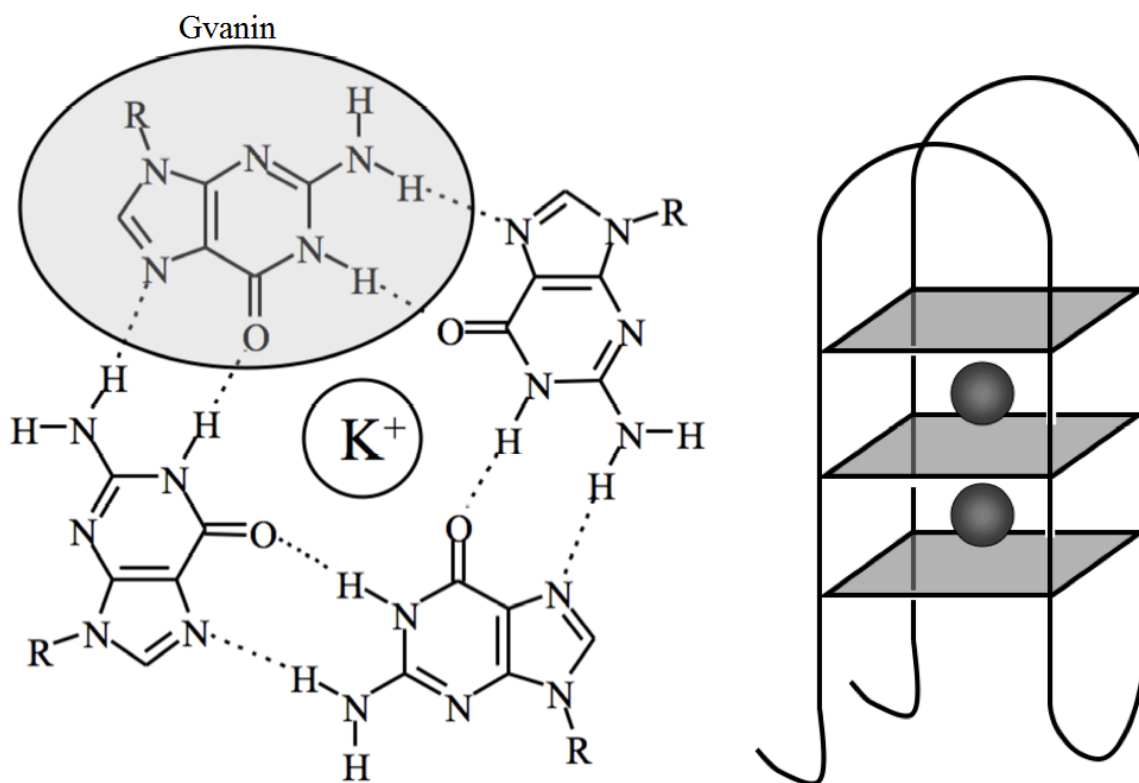
## 2. TELOMERE

Telomere su specijalne strukture na krajevima linearnih kromosoma koje se sastoje od nekodirajućih ponavljanja DNA i proteina koji ih direktno vežu ili se asociraju s njima. U normalnim ljudskim stanicama mogu sadržati do 15 kb uzastopnih ponavljanja heksanukleotida bogatog gvaninima 5' TTAGGG 3' i ta se količina progresivno smanjuje za prosječno 50 do 150 baznih parova po staničnom ciklusu zbog nemogućnosti replikacije kraja

tromog lanca. Naime, DNA polimeraza kod replikacije tromog lanca ne može zamijeniti najudaljeniju RNA klicu te nakon njezine razgradnje na tom mjestu ostaje praznina, odnosno roditeljski lanac bogat gvaninom sadrži 3' produženi jednolančani kraj. Također, krajeve dodatno skraćuju endonukleaze uključene u njihovo procesiranje nakon replikacije. Osim što veliki broj telomernih ponavljanja sprječava da se ovo trošenje krajeva proširi u područja genoma i dovede do gubitka genetske informacije, njihova sekvenca i struktura čine platformu za interakciju s proteinima koji na krajevima kromosoma formiraju zaštitne „kape“ koje su odgovorne za razlikovanje krajeva kromosoma od slobodnih krajeva DNA nastalih dvolančanim lomovima uzrokovanim oštećenjem. Kako se krajevi kromosoma prepoznaju kao oštećenja dolazi do pokretanja procesa popravka DNA i genomske nestabilnosti. Taj proces uključuje egzonukleaznu degradaciju, rekombinaciju i NHEJ i može dovesti do fuzije kromosomskih krajeva. Osim proteinske kape zaštiti pridonosi i sama telomerna DNA kroz formaciju zaštitnih struktura t-petlji i G kvarteta.

## 2.1. G-KVADRUPLEKSI

Kao i molekula RNA, molekula DNA ima sposobnost stvaranja kompleksnih trodimenzionalnih struktura kada nije sputana ograničenjima baznog sparivanja u dvostrukom heliksu. Takva je slobodna DNA prirodno prisutna u 3' produženim G-bogatim krajevima telomera. Gvaninske baze imaju sklonost međusobnom asociranju preko stabilnih vodikovih veza u takozvane G-kvartete (Slika 1.) čije slaganje može dovesti do formacije različitih četverolančanih kvadrupleksnih strukturalnih tipova. Iako nema sigurnih dokaza da telomerna DNA *in vivo* zaista formira G-kvadruplekse, smatra se da bi oni mogli biti iskorišteni za antitumorsku terapiju kao inhibitori telomerase (Neidle i Parkinson, 2003). Indukcija formacije G-kvadrupleksa na 3' produženim krajevima telomera inhibirala bi prvi korak u enzimatskom ciklusu kataliziranom telomerasom te se potencijalni ligandi koji stabiliziraju takve strukture razmatraju za uporabu u kliničkim studijama.



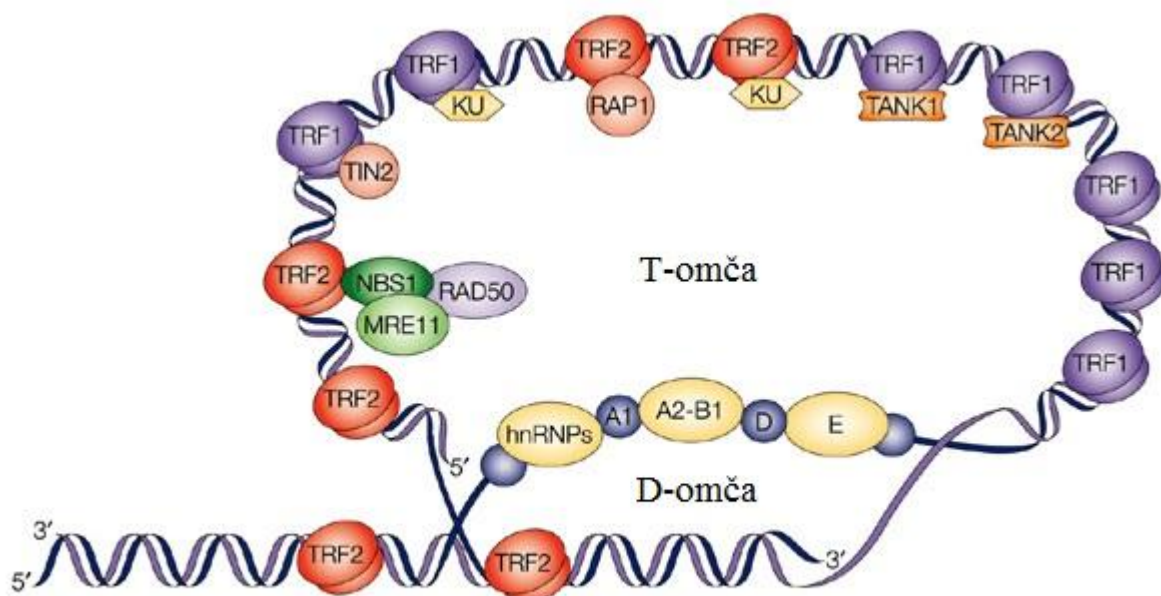
**Slika 1.** Četiri gvaninske baze vodikovim se vezama sparuju u strukturu G-kvarteta koji je stabiliziran metalnim ionom u unutrašnjosti (primjerice  $K^+$ ), a njihovo slaganje stvara čvrstu kvadrupleksnu strukturu. Slika je preuzeta s <http://www.bss.phy.cam.ac.uk/~jlh29/>

## 2.2. VIŠI STUPANJ ORGANIZACIJE TELOMERA

Stukturalne kape koje štite krajeve DNA moraju biti dinamične prirode da bi omogućile dostupnost supstrata za sintezu DNA tijekom replikacije i produžavanja telomera. U fazi replikacije S posebno je važno da linearni kromosomski krajevi budu razlikovani od dvolančanih lomova kako ne bi poremetili stanični ciklus aktivacijom kontrolnih točaka i onemogućili prelazak u fazu G2. Elektronskom mikroskopijom otkriveno je da telomere nisu linearne već stvaraju tzv. t-omče (Slika 2.) koje su rezultat invazije 3' produženog kraja u terminalni dio dvolančane regije telomere. 3' produženi kraj homologno se sparuje s lancem bogatim citozinom u dvolančanoj regiji, a odmiče drugi lanac čime stvara D-omču koja uključuje regiju s umetnutnim 3' krajem. Može uključivati Hollidayevu strukturu, G-kvadrupleks ili trolančanu strukturu. Tako je kraj kromosoma u t-omči sakriven od prepoznanja molekula uključenih u odgovor na oštećenja DNA. Iako replikacija vodećeg lanca DNA generira produkt tupih krajeva, t-omče su prisutne na oba kraja kromosoma. To znači da produkt vodećeg lanca mora biti procesiran 5' egzonukleazama da bi generirao

produženi kraj bogat gvaninom koji će mu omogućiti korištenje istih regulatornih mehanizama kao i kraj tromog lanca.

Proteini TRF1 i TRF2 koji vežu dvolančanu telomernu DNA ključni su za formaciju i stabilizaciju t-omči (Cervantes i Lundblad, 2002). TRF2 je prisutan na mjestu gdje 3' produženi kraj invadira dupleks i u njegovoj odsutnosti telomere, zbog nemogućnosti stvaranja t-omče, gube 3' produženi kraj. Nezaštićeni kromosomski krajevi tada postaju podložni fuzijama procesom nehomolognog spajanja krajeva (NHEJ) uključenim u odgovor na dvolančane lomove uzrokovane oštećenjem. Za formaciju t-omči važan je i POT1 koji se specifično veže na jednolančane telomerne sekvence, a također kontrolira njihovu dužinu. Ova su tri proteina dio kompleksa specifičnog za telomere koji se naziva „šelterin“ ili „telosom“, a uključuje još proteine TIN2, TPP1 i RAP1 koji se ne vežu izravno za telomernu DNA. Osim tih proteina specifičnih jedino za telomerni kompleks, uz telomere su usko povezani i proteini uključeni u popravak DNA, npr. heterodimer Ku70/80 esencijalan za NHEJ, ATM, BRCA1, BRCA2, sustav PARP/tankiraza, DNA PK te rekombinacijski kompleks MRN (MRE11/RAD50/NBS1) koji također imaju uloge u formaciji i stabilizaciji t-omče (Cesare i Reddel, 2008). Sekvestracija tih proteina u telomerno područje omogućava da ih telomere koriste za vlastito strukturalno održavanje, a da u slučaju potrebe lokaliziraju u oštećenim područjima genoma.

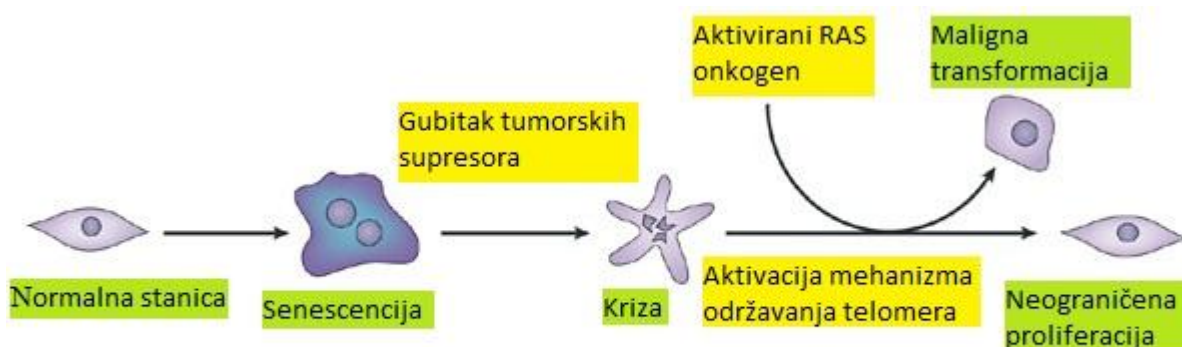


**Slika 2.** Shematska reprezentacija pretpostavljene strukture t-omče sa proteinima koji se vežu za nju. Jednolančana DNA na kraju telomere invadira i prijanja uz dio dvolančane DNA iste telomere (odmicanjem jednog lanca dvolančane DNA formira se D-omča) čime se formira t-omča. Određeni proteini specifično vežu telomernu DNA i regrutiraju druge proteine na kromosomske krajeve. Preuzeto i prilagođeno prema Neumann i Reddel, 2002.

Kako kompleksna struktura telomera ne bi otežala replikaciju, telomerni proteini (npr. TRF2) regrutiraju helikaze RecQ poput WRN i BLM i druge faktore koji mogu ukloniti ili remodelirati telomerne strukture da bi mogle omogućile progresiju replikacijske viljuške (Gilson i Géli, 2007). Stoga nakon svake replikacije obje novonastale telomere moraju iznova stvoriti t-omče i zaštitne kape.

### 2.3. SENESCENCIJA

U normalnim somatskim stanicama sa svakom diobom telomere postaju sve kraće te kad dosegnu kritičnu dužinu stanice postignu svoj replikacijski limit i ulaze u replikativnu senescenciju. Ona uključuje aktivaciju puteva p53 i p16/Rb koji zaustavljaju proliferaciju stanica. Dioba stanice s kritično skraćenim telomerama moguća je jedino inaktivacijom puteva p53 i pRb, međutim, stanice koje se na taj način nastavljaju replicirati ulaze u krizu zbog velike genomske nestabilnosti kromosoma s prekratkim telomerama te ih većina umire. Iz populacije u krizi mogu se pojaviti preživjele stanice koje su stekle sposobnost održavanja telomera na stabilnoj dužini i mogu stvoriti klon imortalnih potomaka podložan malignoj transformaciji (Slika 3.).



**Slika 3.** Normalne somatske stanice trajno izađu iz staničnog ciklusa (postanu senescentne) nakon određenog broja staničnih dioba. Stanice mogu pobjeći iz senescencije gubitkom funkcije gena ključnih tumorskih supresora (posebno p53 i pRb), međutim većina ih na kraju

umire i za takvu se populaciju stanica kaže da je u krizi. Stanice mogu zaobići krizu i postati imortalne (sposobne za neograničenu proliferaciju) ako aktiviraju mehanizam održavanja telomera (telomerasom ili mehanizmom ALT). Takve imortalizirane stanice podložne su malignoj transformaciji aktiviranim onkogenom poput RAS-a. Preuzeto i prilagođeno prema Neumann i Reddel, 2002.

Osim dužine telomera, senescencija može neovisno biti uzrokovana i poremećajima u funkciji asociranih proteina koji su uključeni u njihovu protekciju. Eksperimenti su pokazali da stanice s mutiranim helikazama RecQ ili proteinima ATM mogu ući u senescenciju s telomerama dužim nego u kontrolnim stanicama (Stewart i Weinberg, 2002). Moguće je da kratke telomere aktiviraju senescenciju također kroz promjenu strukture uzrokovanom nemogućnošću formacije potpunog zaštitnog kompleksa jednostavno zbog svoje kratkoće. Kratke telomere koje uzrokuju senescenciju nisu posve nezaštićene i u normalnim senescentnim stanicama ne dolazi do genomske nestabilnosti i ne aktivira se popravak DNA. S druge strane, čini se da su telomere narušenih funkcija nezaštićene jer uzrokuju i aktivaciju kontrolnih točaka staničnog ciklusa i aberantne rekombinacijske događaje. (Stewart i Weinberg, 2002).

### 3. TELOMERAZA

U matičnim stanicama od velike je važnosti da se nekodirajuća telomerna DNA koja se gubi kroz replikaciju nadomješta, kako bi se spriječila smrt stanice ili gubitak genetske informacije. Dužinu telomera održava ribonukleoproteinska reverzna transkriptaza telomeraza u kasnoj S fazi staničnog ciklusa. Telomeraza je jedinstvena DNA polimeraza koja se veže na 3' jednolančani kraj telomere i produžava ga. Sastoji se od proteinske katalitičke komponente s aktivnošću reverzne transkriptaze koja je kodirana genom *hTERT* i *hTERC*, RNA komponente. Ovaj enzim dodaje heksanukleotidna telomerna ponavljanja TTAGGG koristeći vlastiti endogeni RNA kalup (Reddel, 2002).

Kalup RNA u 11 je baza komplementaran telomernom jednolančanom produžetku te tako pozicionira katalitičku podjedinicu i služi kao kalup za sintezu telomerne DNA na 3' produženom kraju koji ima ulogu početnice. Nakon dodatka šest baza (jednog telomernog ponavljanja), telomeraza translocira i sintetizira novo ponavljanje na procesivan način. Tako se jednolančani kraj bogat gvaninom produžuje i tako omogućuje i dodatno produženje lanca bogatog citozinom staničnom replikacijskom mašinerijom kompenzirajući eroziju krajeva.



Aktivnost telomeraze u sprezi je s replikacijom genoma (djeluje u S fazi), dakle produžavanje telomera događa se neposredno nakon replikacije dok su 3' krajevi još slobodni, odnosno nisu zaštićeni strukturom t-omče (Gilson i Geli, 2007).

Telomeraza je eksprimirana u embrionskim stanicama, no normalno dolazi do utišavanja gena *hTERT* tijekom razvoja. Prisutna je u adultnim stanicama muške germinativne linije, no nije eksprimirana u somatskim stanicama osim proliferativnim stanicama obnovljivih tkiva gdje je njezina aktivnost regulirana, poput hematopoetskih matičnih stanica ili aktiviranih limfocita. Aktivnost telomeraze u adultnim matičnim stanicama ne omogućuje im da postanu imortalne jer je strogo regulirana. Dolazi do progresivnog skraćanja telomera usprkos produžavanju, no ono je usporeno. 85% ljudskih tumora i imortalnih staničnih linija izbjegava senescenciju ponovnom aktivacijom ekspresije telomeraze (Reddel, 2002).

#### 4. ALTERNATIVNO PRODUŽAVANJE TELOMERA

Neki tumori produžuju telomere u odsutstvu telomeraze alternativnim putem produžavanja telomera (ALT). Ekspresija telomeraze u ovim stanicama utišana je metilacijom CpG otoka njezine katalitičke podjedinice *hTERT* (Henson i sur. 2002). ALT, preko puteva homologne rekombinacije i popravka DNA, omogućava replikaciju telomerne DNA, međutim detalji mehanizma nisu poznati. Iako proteini uključeni u homolognu rekombinaciju i popravak DNA imaju važne uloge u normalnoj biologiji telomera, ALT je detektiran samo u nenormalnim situacijama: tumorskim stanicama i imortalnim staničnim linijama.

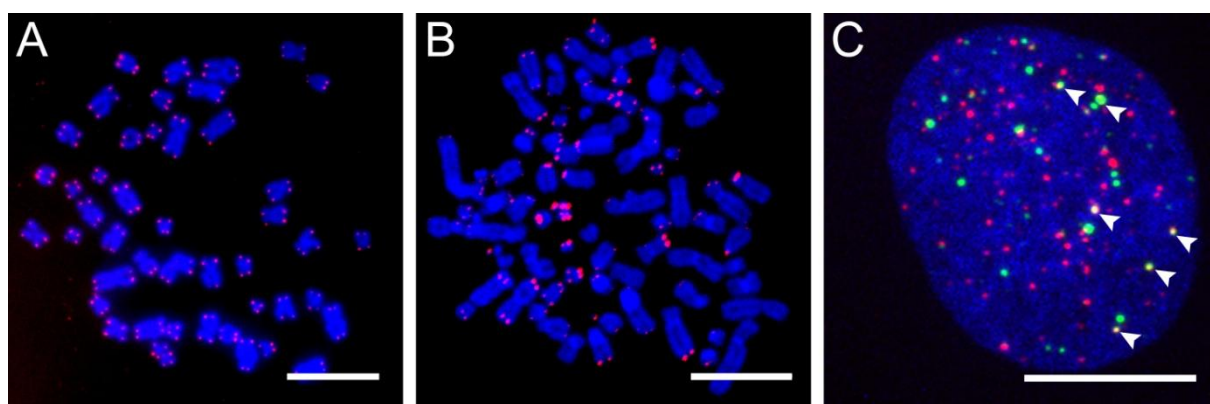
##### 4.1. KARAKTERISTIKE STANICA S MEHANIZMOM ALT

ALT-pozitivne stanice ne mogu se prepoznati po aktivnosti nekog specifičnog proteina kao stanice u kojima se eksprimira telomeraza, no obično ih je moguće prepoznati po karakterističnim fenotipskim značajkama. Tako se mogu identificirati bez potrebe uzgoja kroz dugo vremensko razdoblje da bi se dokazalo da održavaju telomere neovisno o telomerazi.

Distribucija duljine telomera takvih stanica izrazito je heterogena i varira od manje od 3 kb do iznad 50 kb, sa srednjom vrijednošću od oko 20 kb. Normalne somatske stanice, za razliku od toga, imaju homogenu dužinu telomera od oko 15 kb koja progresivno opada na 5-8 kb u senescenciji. Imortalne stanice s aktivnom telomerazom imaju relativno homogene dužine telomera koje se održavaju na oko 10 kb (Slika 4. A, B). U stanicama koje *in vitro*

postaju imortalne aktivacijom ALT-a postoji vremenska korelacija između imortalizacije i nastanka karakterističnog fenotipa dužine telomera (Henson i sur. 2002).

U jezgrama stanica s ALT mehanizmom jezgrena tjelešca PML (PML-NB, engl. *promyelocytic leukemia nuclear bodies*) asociraju s pojedinim telomerama i ti se kompleksi nazivaju jezgrena tjelešca PML asocirana s ALT, skraćeno APB (Slika 4. C). Nisu prisutni u preimortalnim stanicama, a moguće ih je detektirati u stanici koja prolazi imortalizaciju istovremeno kad nastaje karakterističan uzorak dužine telomera (Yeager i sur. 1999), pa se smatraju jednim od najvažnijih dijagnostičkih markera. Sadrže protein PML, telomernu DNA, TRF1, TRF2, i faktore uključene u popravak i rekombinaciju DNA.



**Slika 4.** Karakteristične fenotipske značajke stanica s ALT mehanizmom. Telomerna su ponavljanja obojana sondama obilježenim s Cy3. (A) Normalni limfociti pokazuju homogenu distribuciju dužine telomernih ponavljanja. (B) Velika varijacija dužine telomernih ponavljanja u stanicama U2OS s mehanizmom ALT. Intenzivni signali nekih kromosomskih krajeva ukazuju na velik broj telomernih ponavljanja, dok nedostatak signala na drugim kromosomima indicira jako kratka telomerna ponavljanja. (C) Imunofluorescencija proteina PML (zeleno) i proteina TRF2 (crveno) u staničnoj jezgri stanica U2OS s ALT mehanizmom pokazuje prisutnost jezgrenih tjelešaca PML asociranih s ALT kod nekih telomera (označeno strelicama). DNA je obojana bojom DAPI. Dužina skale je 10  $\mu\text{m}$ . Slika je preuzeta iz Chung i sur. 2012.

U jezgri stanica s ALT mehanizmom moguće je pronaći i nekoliko klasa ekstrakromosomskih telomernih ponavljanja na koje su vezani telosomski proteini. To mogu biti jednolančane ili dvolančane cirkularne molekule, linearna telomerna ponavljanja ili razgranate molekule DNA visoke molekulske mase. Takve strukture mogu nastati rezolucijom t-omče rekombinacijskim enzimima (Chung i sur. 2012).

Izmjena telomera sestrinskih kromatida generalno je češća u ALT stanicama iako frekvencija homologne rekombinacije za ne-telomerne sekvence nije izmijenjena. To znači da nema generalnih promjena u rekombinacijskoj mašineriji ALT-pozitivnih stanica (Bechter i sur. 2004, Londono-Vallejo i sur. 2004).

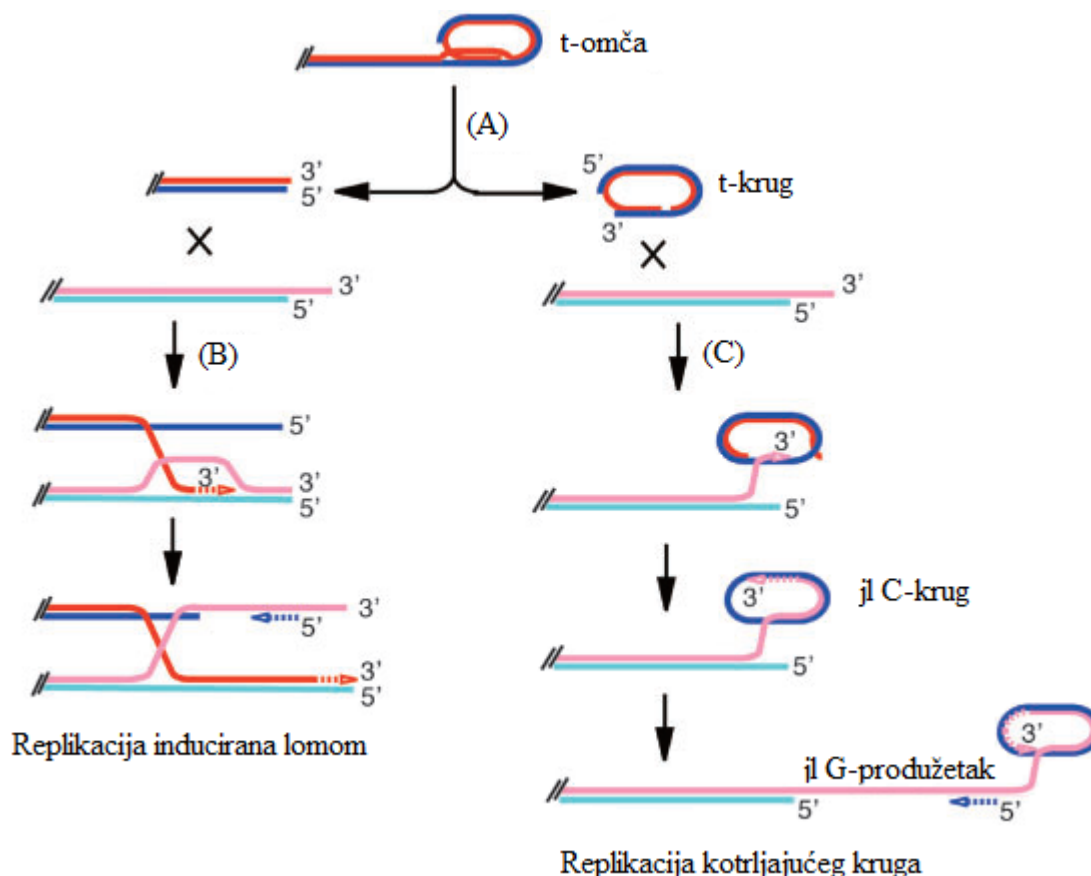
#### 4.2. ALT I HOMOLOGNA REKOMBINACIJA

Distribucija dužina telomera u stanicama s ALT mehanizmom je dinamična, s fluktuacijama dužine individualnih telomera tijekom stanične proliferacije. Može doći do naglih povećanja dužine telomernih ponavljanja kao i do naglih delecija što je u skladu s teorijom da su promjene duljine telomera ovisne o rekombinacijskim procesima. Dokazano je da u ljudskim stanicama s ALT mehanizmom dolazi do intertelomernih rekombinacija uvođenjem markera u njihove telomere. Analizom klonalne kulture ustanovljeno je da se marker s telomere jednog kromosoma detektirao i na drugim kromosomima što se nije dogodilo kod stanica s telomerazom. Ti podaci ukazuju na mehanizam homologne replikacije koji se naziva „replikacija inducirana lomom“. U tom procesu, nakon dvolančanog loma, 3' jednolančani kraj kromosoma nastao procesiranjem nakon loma napada dvolančanu homolognu regiju neoštećenog lanca, a zatim DNA polimeraza 3' invadirajući kraj koristi kao početnicu, a neoštećeni lanac kao kalup za replikaciju. Analogno, 3' kraj jednolančanog produžetka telomere može imati ulogu 3' kraja nastalog lomom, a lanac druge telomere poslužiti kao kalup i to bi rezultiralo povećanjem ukupne količine telomerne DNA u stanici. Kao kalup za elongaciju 3' kraja telomere po istom principu također bi mogla poslužiti dvolančana regija iste telomere nakon formiranja strukture t-omče (intratelomerna rekombinacija).

Ekstrakromosomska telomerna ponavljanja također bi mogla sudjelovati u rekombinaciji s telomerama, kružne molekule se homolognom rekombinacijom mogu ubaciti u telomernu sekvencu i tako ju produžiti, a linearne razmijeniti dio sekvence s telomerom ili poslužiti kao kalup za replikaciju induciranu lomom. Posebno su zanimljive cirkularne molekule koje se nazivaju još i t-krugovi. Kod nekih vrsta eukariota mitohondriji sadrže linearnu DNA koja na krajevima ima specijalne strukture analogne kromosomskim telomerama. Međutim, u njima nije pronađena telomeraza, a uvijek se pojavljuju dvolančani t-krugovi (cirkularne molekule koje su građene od telomernih ponavljanja). Pronalaskom intermedijera reaplikacije nastalik mehanizmom kotrljajućeg kruga dokazana je aktivna uloga t-krugova u održavanju telomera (Tomaska i sur. 2004). Ovim procesom mogu se generirati

duge linearne molekule uzastopnih telomernih ponavljanja koje homolognom rekombinacijom s linearnom mitohondrijskom DNA mogu produžiti njezine krajeve. Eksperimenti na *K. lactis* null-mutantu za telomerazu pokazali su da t-krugovi mogu poslužiti i kao kalup za direktnu sintezu telomera. Nakon rekombinacijske invazije 3' kraja telomere u heliks t-kruga 3' kraj može preuzeti ulogu početnice za replikaciju mehanizmom kotrljajućeg kruga. Ovakva replikacija je kontinuirani proces te čak i mali cirkularni kalupi mogu dovesti do vrlo učinkovitog i brzog produženja telomera. Model „kotrljanja i širenja“ predviđa da nakon što se jedna telomera produži na ovaj način, intertelomerna rekombinacija omogućuje elongaciju ostalih telomera (Tomaska i sur. 2004). U humanim stanicama s ALT mehanizmom, osim t-krugova česte su i jednolančane strukture ekstrakromosomske telomerne DNA. Dok su jednolančane strukture bogate gvaninom najčešće linearne, one bogate citozinom stvaraju cirkularne molekule. C-krugovi su jedinstveni za stanice s ALT mehanizmom te mogu kao i t-krugovi poslužiti kao kalup u replikaciji kotrljajućeg kruga. Jednolančane linearne molekule bogate gvaninom slične intermedijerima replikacije kotrljajućeg kruga u mitohondrijumu. (Nabetani i Ishikawa, 2011). Proces nastanka t-krugova nije poznat, no neki od predloženih mehanizama uključuju rezoluciju t-omče, homolognu rekombinaciju unutar dvolančane regije telomere i cirkularizaciju linearne ekstrakromosomske telomerne DNA (Tomaska i sur, 2004).

Mehanizmi replikacije inducirane lomom i kotrljajućeg kruga nisu značajno različiti jedan od drugog: za oboje je potrebna invazija jednolančanog 3' kraja bogatog gvaninom u dvolančanu homolognu regiju i njegovo prijanjanje uz lanac bogat citozinom te inicijacija sinteze DNA na mjestu njihova sparivanja (Slika 5). To implicira da oba mogu pridonositi ALT mehanizmu (konzistentno s modelom „kotrljanja i širenja“) i biti regulirani zajedničkim molekularnim mehanizmima.



**Slika 5.** Modeli replikacijskih mehanizama produžavanja telomera ALT stanica temelje se na različitim rekombinacijskim događajima. (A) Rekombinacijska rezolucija t-omče može dovesti do značajnog skraćenja telomere i generacije t-kruga. (B) Intertelomerna rekombinacija inicira replikaciju induciranu lomom. (C) Invazija t-kruga 3' G-produženim krajem aktivira replikaciju mehanizmom kotrljajućeg kruga. Preuzeto i prilagođeno prema Nabetani i Ishikawa, 2011.

Povišena razina izmjene telomera sestrinskih kromatida ukazuje na još jedan mogući mehanizam produživanja telomera: velika je vjerojatnost da zbog repetitivne prirode telomerne DNA kod izmjene kromatida dođe do nejednolikog prekriženja pri čemu će jedna telomera postati duža, a druga kraća. Moguće je da se kromosomi s produljenim telomerama zatim preferentno tijekom mitoze segregiraju u jednu stanicu kćer ili da se duge telomere prošire na ostale kromosome replikacijom na temelju intertelomerne rekombinacije.

#### 4.3. JEZGRENA TJELEŠCA ALT-PML-NB

Jezgrena tjelešca PML (PML-NB) mobilne su strukture u jezgri stanice koje formiraju tjelešca promjera 0,2 do 1  $\mu\text{m}$ , a njihov broj u stanici varira između 5-30, ovisno o tipu

stanice, fazi staničnog ciklusa, stadiju diferencijacije i vanjskim podražajima. Glavne strukturalne komponente su proteini PML i SP100 koji grade sferičnu okosnicu s kojom se dinamično asociraju drugi proteini. Pritom važnu ulogu u stabilizaciji strukture i regrutiranju proteina ima sumoilacija koja omogućava nekovalentno povezivanje s proteinima koji sadrže domenu SIM (Chung i sur. 2012).

U normalnim stanicama PML-NB ne sadrže nukleinske kiseline, međutim, pokazano je da u stanicama s ALT mehanizmom dio PML-NB kolokalizira s telomernom DNA (Yeager i sur. 1999) i takve se strukture nazivaju PML-NB asocirana s ALT, skraćeno APB. Sastoje se od komponenata PML-NB poput PML, SP100 i SUMO te proteina specifičnih za telomere poput TRF1, TRF2, POT1 i RAP1. Također sadrže faktore vezane za odgovor na oštećenje i popravak DNA, poput komponenti kompleksa 9-1-1, fosforilirane histonske varijante H2A.X, helikaze RecQ BLM, proteina SMC i proteina uključenih u homolognu rekombinaciju: MUS18, RPA, RAD51, RAD52, BRCA1 i kompleksa MRN. Istraživanja većine ovih proteina pokazala su da su potrebni za održavanje fenotipa i proliferativnog kapaciteta stanica s ALT mehanizmom (Zhong i sur. 2007, Nabetani i Ishikawa, 2011).

Prema dosad poznatim informacijama o PMB-NB i APB moguće je da tvore katalitičke površine kojima povećavaju efikasnost određenih procesa. Pretpostavlja se da je funkcija APB-a formacija platforme za aktivno produživanja telomera osiguravanjem kalupa za rekombinacijsku replikaciju i/ili regrutiranjem proteina koji omogućavaju te procese. APB bi mogao osigurati kalup za produživanje kroz nakupljanje ekstrakromosomskih telomernih ponavljanja ili poticanjem okupljanja telomera, što bi omogućilo intertelomerne rekombinacije (Chung i sur. 2012). Sposobnost formacije APB u tom bi slučaju bila neophodna za mogućnost aktivacije puteva ALT i jedan od mogućih ciljeva antitumorske terapije malignih stanica s ALT mehanizmom. Također, univerzalna prisutnost APB mogla bi pružiti osnovu za razvijanje jednostavnih dijagnostičkih markera prisutstva aktivnosti ALT u tumorskim stanicama.

#### 4.4. ALT I DISFUNKCIJA TELOMERA

U normalnim stanicama nukleoproteinska struktura telomera štiti telomernu DNA od procesa koji mogu uzrokovati genomsku nestabilnost, uključujući rekombinaciju. Jedno moguće objašnjenje aktivacije ALT-a je poremećaj u kompleksnoj kontroli stvaranja telomernih struktura. To je posljedica povišene razine homologne rekombinacije u području

telomera zbog nerazlikovanja telomera od lomova uzrokovanih oštećenjem DNA. U stanicama sisavaca neki od telomernih rekombinacijskih mehanizama vezanih uz ALT mogu biti inducirani nakon eksperimentalnog narušavanja funkcija proteina koji čine telosom. U modelnim organizmima disfunkcija telomera također može dovesti do povišene razine rekombinacije. Npr. kod mutanata *K. lactis*, kad telomere postanu kritično skraćene zbog odsutnosti telomerase, također se javlja povišena razina rekombinacije čiji uzrok bi mogla biti nemogućnost vezanja dovoljno proteina, te je onemogućeno stvaranje normalne telomerne strukture koja sprječava rekombinaciju.

Stanice s ALT mehanizmom također pokazuju mnoge karakteristike koje su specifične za stanice s disfunkcionalnim telomerama. Npr. na nekim krajevima kromosoma ne mogu se detektirati telomerna ponavljanja, dok su u svim fazama staničnog ciklusa vidljivi fokusi inducirani disfunkcijom telomera što ukazuje na prisutstvo nezaštićenih kromosomskih krajeva. Tumori koji koriste ALT mehanizam također pokazuju veliku kromosomsku nestabilnost čiji bi uzrok mogla biti fuzija nezaštićenih kromosomskih krajeva, tj. ponovljeni ciklusi fuzije i lomova kromosoma tijekom staničnih dioba.

Veza između povišene rekombinacije i disfunkcije telomera ukazuje na to da je za imortalizaciju putem ALT mehanizma potrebno da putevi koji u normalnoj stanici reagiraju na disfunkcionalne telomere budu inhibirani (Cesare i Reddel, 2008). To je u skladu s činjenicom da je u većini ALT staničnih linija izgubljena funkcija puta p53 za koji se smatra da odgovara na oštećenje DNA i disfunkcionalne telomere aktivacijom senescencije ili apoptoze. Gubitak funkcije p53 s istovremenim pojavljivanjem fokusa induciranih disfunkcijom telomera ukazuje da je u stanici poremećeno prepoznavanje disfunkcionalnih telomera. Ponovna indukcija puta p53 u stanicama s ALT mehanizmom dovodi do bloka staničnog ciklusa i senescencije.

Mnogo je mogućih mehanizama koji bi mogli objasniti kako disfunkcija telomera dovodi do povišene razine rekombinacije i ALT-a. Deregulacija nekog rekombinacijskog koraka, odnosno proteina potrebnog za formiranje t-omče mogla bi telomere ostaviti nezaštićene i sklone rekombinaciji. S druge strane, rezolucija stvorene t-omče mogla bi rezultirati skraćenim telomerama sklonijim intertelomernoj rekombinaciji i t-krugovima koji mogu služiti kao kalup za replikaciju „kotrljajućeg kruga“. Deregulacija procesa stvaranja t-omče mogla bi umjesto invazije jednolančanog 3' produžetka u dvolančano područje iste telomere promovirati invaziju u druga telomerna ponavljanja. Vjerojatno je da ne postoji

jedan univerzalan ALT mehanizam, već on ovisi o specifičnoj kombinaciji mutacija proteina koji uzrokuju telomernu disfunkciju i tumor supresorskih gena.

Također je moguće da se aktivnost slična ALT-u normalno događa u stanicama sisavaca kao mehanizam popravka slučajno skraćenih telomera, kao alternativa ili dodatak telomeraznoj aktivnosti. Primjerice, telomere B-limfocita miševa kojima je mutirana telomeraza produžuju se u germinativnim centrima, iako manje nego kod miševa divljeg tipa, što znači da mora biti prisutan neki mehanizam produžavanja telomera. Fenotip tumorskih stanica s ALT mehanizmom tom bi slučaju bio rezultat nepravilne regulacije tog mehanizma (Cesare i Reddel, 2008).

Dakle, najvjerojatnije je da disfunkcija telomera u povezanosti s gubitkom funkcije tumor supresorskih gena dovodi do trajnog uključivanja odgovora na oštećenje DNA koji djeluje na telomere i omogućuje im rekombinacije zabranjene u normalnim stanicama te posljedično produžavanje. Represija ALT-a u tome je slučaju intrinzična osobina normalne funkcije telomera i gubitak te funkcije dovodi do aktivnosti mehanizama ALT (Cesare i Reddel, 2008).

## 5. TELOMERAZA ILI ALT?

Telomeraza je specifična za eukariotske stanice dok su rekombinacijski procesi potrebni za ALT prisutni u svim carstvima živog svijeta. Neki eukarioti koji nemaju telomerazu održavaju telomere rekombinacijom, no većina eukariota ipak ima telomerazu. Postavlja se pitanje zašto je u eukariotskom carstvu uopće došlo do razvoja telomeraze s obzirom da je već postojala evolucijski starija rekombinacijska mašinerija. Odgovor se vjerojatno krije u jednostavnijoj kontroli regulacije produživanja telomera (Neumann i Reddel, 2002). Telomeraza, za razliku od ALT, ima jasne funkcije u određenim normalnim uvjetima te njezina aktivnost ne kompromitira zaštitnu funkciju telomera. Prema tome, njezina je pojava omogućila odvajanje funkcija zaštite i produživanja kromosomskih krajeva čime je omogućena njihova zasebna regulacija i zaseban evolutivan put.

Iako i telomeraza i ALT omogućuju imortalizaciju stanica te maligni tumori mogu koristiti oba mehanizma, oni nisu ekvivalentni. Primjerice, postoje dokazi da telomeraza pridonosi tumorigenezi i nekim aktivnostima koje nisu vezane uz održavanje telomera. Također, telomere koje nastaju telomeraznom aktivnošću ili ALT-om nemaju ista svojstva. Usprkos većoj srednjoj dužini telomera, u većini stanica s ALT mehanizmom mogu se



pronaći i vrlo kratke telomere koje su sklonije fuzijskim događajima zbog čega bi ALT tumori mogli biti genetski nestabilniji (Neumann i Reddel, 2002). Povezivanje osobina tumora s tipom mehanizma moglo bi se pokazati korisnim za prognostičke svrhe. Tip mehanizma održavanja telomera koji će tumorska stanica razviti, dijelom ovisi o porijeklu tumora, odnosno tipu tkiva iz kojeg se tumor razvio. ALT se najčešće pojavljuje u tumorima mezenhimskog porijekla, a pretpostavlja se da je uzrok tome čvršća regulacija telomeraze u mezenhimu zbog sporijeg obnavljanja stanica i manjeg skraćanja telomera (Henson i sur. 2002). Postoje dokazi da u nekim tumorima mogu biti aktivirani i ALT i telomeraza. U njima se može pronaći i telomerazna aktivnost i karakterističan uzorak dužine telomera za ALT. Nije poznato je li to zbog heterogenosti tumora, koji može u nekim stanicama koristiti mehanizme ALT, a u drugima telomerazu ili oba mehanizma koegzistiraju u stanici (Reddel 2003). Postoji mogućnost da je ALT, osim u tumorima bez telomeraze prisutan i u nekima od tumora s telomerazom koji čine 85% svih tumora. To znači da bi njegova pojavnost mogla biti mnogo češća, međutim, da bi se to utvrdilo potrebno je razviti bolje dijagnostičke metode za rutinsko određivanje aktivnosti ALT.

Mehanizam održavanja telomera pogodan je cilj antitumorske terapije jer postoji u svim tumorima, a zdrave ga stanice u pravilu ne koriste pa bi njegova inhibicija imala minimalne nuspojave. Rezultati takvih terapija ne bi bili brzo vidljivi jer je nakon inaktivacije produženja telomera potreban određeni broj udvostručenja tumorske populacije, da bi se telomere dovoljno skratile i inducirale senescenciju ili apoptozu tumorskih stanica. Nekoliko je metoda razvijeno za inhibiciju telomerazne aktivnosti u tumorima s telomerazom te su došle do treće faze kliničkih testiranja. Međutim, tretman tumora telomeraznim inhibitorima mogao bi selekcijskim pritiskom dovesti do odabira stanica koje su aktivirale ALT, čak i u tumorima koji na početku nisu imali aktivne mehanizme ALT. To bi se u praksi manifestiralo kao razvitak rezistencije na tretman, a moglo bi doći i do promjena drugih osobina tumora. Vjerojatno vrijedi i obrnuto te bi tretman stanica s mehanizmima ALT inhibitorima za ALT mogao selekcijski djelovati na telomeraznu aktivnost. Stoga je za uspješan razvoj antitumorskih tretmana baziranih na mehanizmima održavanja telomera ključno uzeti u obzir oba mehanizma.

## 6. ZAKLJUČAK

Razvoj antitumorskih terapija usmjerenih protiv održavanja telomera, usprkos tome što većina tumora koristi telomerazu, neće biti uspješan ako se u obzir ne uzme i ALT. Bez mogućnosti njegove inhibicije uspješnost će takvih tretmana biti znatno manja, a moglo bi doći i do neželjenih nuspojava poput evolucije tumora s nepredviđenim posljedicama. Kako bi se razvili uspješni inhibitori mehanizama ALT potrebno je mnogo bolje poznavanje njihovih procesa. Zasad dostupne informacije o stanicama s mehanizmima ALT i normalnoj biologiji telomera ukazuju na usku povezanost neodgovarajućeg odgovora takvih stanica na disfunkciju telomera s rekombinacijskim procesima koji su posljedica aktivacije mehanizama popravka DNA. Međutim, potrebna su još mnoga istraživanja koja će direktno utvrditi točne molekularne mehanizme u pitanju te genetsku podlogu njihove aktivacije u tumorskim stanicama. Također, neophodno je pronaći jednostavne dijagnostičke markere za ALT kako bi se rutinski mogli identificirati tumori u kojima je aktivan. To bi, osim za planiranje tretmana, dalo vrijedne podatke za prognostičke implikacije ovisne o tome koristi li tumor telomerazu ili ALT za održavanje svojih telomera. Idealna za univerzalnu antitumorsku terapiju bila bi tvar koja bi istovremeno inhibirala i telomerazu i ALT, što znači da bi morala djelovati na strukturu krajeva kromosoma tako da istovremeno onemogući i vezanje telomerase i rekombinacijske događaje. Potencijal za takvo djelovanje mogle bi imati tvari koje stabiliziraju G-kvadruplekse: brza formacija G-kvadrupleksa na 3' produženom kraju odmah nakon replikacije telomera mogla bi 3' kraj učiniti nedostupnim za vezanje telomerase kao i za invaziju homologne regije. Istraživanja ALT-a također bi mogla dovesti do novih uvida u funkcije telomera i procese popravka DNA.

## 7. LITERATURA

- Bechter O. E., Shay J. W., Wright W. E. **The frequency of homologous recombination in human ALT cells.** *Cell Cycle* 2004, **3:5**, 547-549
- Cervantes R. B., Lundblad V. **Mechanisms of chromosome-end protection.** *Current Opinion in Cell Biology* 2002, **14**:351-356
- Cesare, A. J., Reddel, R.R. **Telomere uncapping and alternative lengthening of telomeres.** *Mech. Ageing Dev.* 2008, doi:10.1016/j.mad.2007.11.006
- Chung I., Osterwald S., Deeg K. I., Rippe K. **PML body meets telomere: The beginning of an ALternate ending?** *Nucleus* 2012, **3:3**, 263-275
- Gilson E., Géli V. **How telomeres are replicated.** *Nature reviews/Molecular Cell Biology*, 2007, **8**:825-838
- Henson J. D., Neumann A. A., Yeager T. R., Reddel R. R. **Alternative lengthening of telomers in mammalian cells.** *Oncogene* 2002, **21**:598-610
- Londono-Vallejo J. A., Der-Sarkissian H., Cazes L., Bacchetti S., Reddel R. R. **Alternative lengthening of telomers is characterized by high rates of telomeric exchange.** *Cancer Research* 2004, **64**:2324-2327
- Nabetani A., Ishikawa F. **Alternative lengthening of telomeres pathway: Recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells.** *J. Biochem.* 2011, **149**(1):5–14
- Neidle S., Parkinson G. N. **The structure of telomeric DNA.** *Current Opinion in Structural Biology* 2003, **13**:275–283
- Neumann A. A., Reddel R. R. **Telomere maintenance and cancer – look, no telomerase.** *Nature Reviews/Cancer* 2002, **2**:879-884
- Reddel R. R. **Alternative lengthening of telomers, telomerase, and cancer.** *Cancer Letters* 2003, **194**:155-162
- Stewart S. A., Weinberg R. A. **Senescence: does it all happen at the ends?** *Oncogene* 2002, **21**:627-630

Tomaska L., McEachern M. J., Nosek J. **Alternatives to telomerase: keeping linear chromosomes via telomeric circles.** *FEBS Letters* 2004, **576**:142-146

Yeager T. R., Neumann A. A., Englezou A., Huschtscha L. I., Noble J. R., Reddell R. R. **Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body.** *Cancer Research* 1999, **59**:4175-4179

Zhong Z.-H., Jiang W.-Q, Cesare A. J., Neumann A. A., Wadhwa R., Reddel R. R. **Disruption of Telomere Maintenance by Depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 Complex in Cells That Use Alternative Lengthening of Telomeres.** *J. Biol. Chem.* 2007, **282**:29314-29322

<http://www.bss.phy.cam.ac.uk/~jlh29/>

## 8. SAŽETAK

Neograničen proliferativni kapacitet tumora i imortalnih staničnih linija ovisi o sposobnosti održavanja dužine telomera i obično se bazira na aktivaciji telomerase, RNA-ovisne DNA polimeraze koja reverznom transkripcijom endogenog RNA kalupa sintetizira telomerna ponavljanja izravno na krajevima kromosoma. Međutim, znatan broj tumora može produživati telomere i bez prisutstva telomerase mehanizmima alternativnog produžavanja telomera (ALT). Temelj ALT-a su replikacijski procesi ovisni o rekombinaciji kod kojih se kao kalup za sintezu dodatnih telomernih ponavljanja mogu koristiti druge telomere ili izvankromosomska telomerna ponavljanja, međutim molekularni procesi nisu razjašnjeni. Aktivnost ALT prepoznata je samo u nenormalnim stanicama i čini se da je njezino djelovanje usko povezano s poremećajem normalne funkcije telomera koja je primarno zaštita krajeva kromosoma kako ne bi bili zamijenjeni za dvolančane lomove nastale oštećenjem. Sukladno tome, samo produžavanje telomera posljedica je stalnog djelovanja stanične mašinerije za popravak na telomernu DNA. Mehanizmi održavanja telomera dobra su meta za razvoj antitumorskih tretmana: pojavljuju se u svim tumorima, većina zdravih stanica ih ne koristi i očekivane su nuspojave takvih tretmana minimalne. Većina istraživanja u tom smjeru provodi se na telomeraznim inhibitorima, međutim, da bi takvi tretmani zaista bili uspješni neophodno je da se u obzir uzme i ALT te da se bolje istraže mehanizmi i genetska podloga njegova djelovanja.

## 9. SUMMARY

Unlimited proliferative capacity of tumor cells and immortal cell lines depends on their ability to maintain their telomeres, usually by activating telomerase, an RNA-dependent DNA polymerase that adds telomere repeats directly on the ends of chromosomes by reverse-transcribing an endogenous RNA template. On the other side, a number of tumors can also lengthen their telomeres without telomerase by means of alternative lengthening of telomeres (ALT). ALT is based on recombination-dependent replication processes that can use other telomeres or extrachromosomal telomeric repeats as templates for telomere elongation. Molecular basis of these processes are not yet clear. ALT activity has only been detected in abnormal cells and it seems that it is closely related to dysfunction in telomeres. These telomere dysfunctions compromise the roles they normally play in chromosome end protection and chromosomal ends are recognized as double stranded breaks caused by DNA damage. The telomere elongation itself is, by that definition, a consequence of cell repair machinery constantly acting on telomeric DNA. Telomere maintenance mechanisms could be used as a good target for cancer treatment because they appear in all tumors but not in healthy cells, so their inhibition should show minimal side-effects. Most research in that direction is based on telomerase inhibitors but for most successful results ALT also needs to be taken in consideration and its mechanisms and genetic background further investigated.